

# 4-METHOXY-1-BENZOPYRAN-2-ONE COMPOUND AND ITS APPLICATION

**Publication number:** JP2004123621 (A)

**Publication date:** 2004-04-22

**Inventor(s):** TAKAHASHI JUNYA; AZUMA SEISHI +

**Applicant(s):** SUMITOMO CHEMICAL CO +

**Classification:**

- international: C07D311/56; A61K31/37; A61P1/16; A61P9/10; A61P9/12; A61P11/00; A61P13/12; A61P17/00; A61P17/02; A61P29/00; A61P43/00; C07D311/00; A61K31/366; A61P1/00; A61P9/00; A61P11/00; A61P13/00; A61P17/00; A61P29/00; A61P43/00; (IPC1-7): C07D311/56; A61K31/37; A61P1/16; A61P9/10; A61P9/12; A61P11/00; A61P13/12; A61P17/00; A61P17/02; A61P29/00; A61P43/00

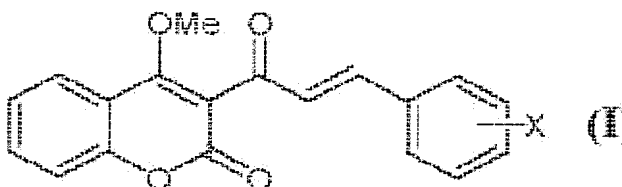
- European:

**Application number:** JP20020290842 20021003

**Priority number(s):** JP20020290842 20021003

## Abstract of JP 2004123621 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To develop and obtain a medicine, or the like, which improves tissue fibrosis by decreasing the expression level of a type I collagen gene in a tissue thereby to lower the accumulation amount of collagen. ; **SOLUTION:** There are provided a 4-methoxy-1-benzopyran-2-one compound represented by formula (I) (wherein X is methoxy or ethoxy group); a type I collagen gene transcription inhibitor comprising the compound as an effective ingredient; the use of the type I collagen gene transcription inhibitor for improving tissue fibrosis by decreasing the expression level of the type I collagen gene thereby to lower the accumulation amount of collagen; a medicine used for improving tissue fibrosis and comprising the compound as an effective ingredient; and a method used for improving tissue fibrosis and comprising a step for prescribing an effective amount of the compound for a mammal diagnosable as fibrosis. ; COPYRIGHT: (C)2004,JPO



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-123621

(P2004-123621A)

(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C07D 311/56  
A61K 31/37  
A61P 1/16  
A61P 9/10  
A61P 9/12

F I

C07D 311/56  
A61K 31/37  
A61P 1/16  
A61P 9/10 1 O 1  
A61P 9/12

テーマコード (参考)

4 C 0 6 2  
4 C 0 8 6

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-290842 (P2002-290842)  
(22) 出願日 平成14年10月3日 (2002.10.3)

(71) 出願人 000002093  
住友化学工業株式会社  
大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
(74) 代理人 100093285  
弁理士 久保山 隆  
(74) 代理人 100113000  
弁理士 中山 亨  
(74) 代理人 100119471  
弁理士 榎本 雅之  
(72) 発明者 高橋 淳也  
兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ  
クノサービス株式会社内  
(72) 発明者 東 清史  
大阪市此花区春日出中三丁目1番98号  
住友化学工業株式会社内

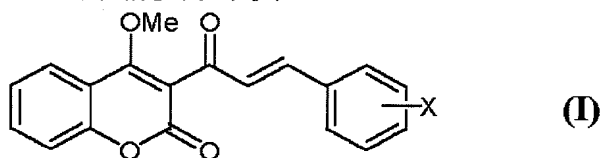
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物及びその利用

(57) 【要約】

【課題】組織におけるI型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させ、コラーゲン蓄積量を低下させることにより、組織の線維化を改善させる薬剤等を開発・提供すること。

【解決手段】式(I)



(式中、Xはメトキシ基又はエトキシ基を示す。)

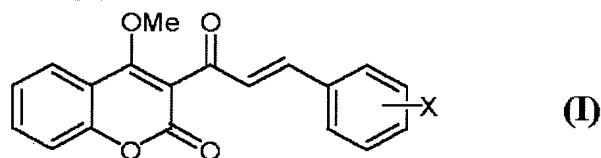
式中に示される4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物、当該化合物を有効成分として含有することを特徴とするI型コラーゲン遺伝子転写抑制剤、I型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線維化を改善するための前記I型コラーゲン遺伝子転写抑制剤の使用、前記化合物を有効成分として含有することを特徴とする組織の線維化を改善させる薬剤、線維症であると診断されうる乳動物に対して有効量の前記化合物を投与する工程を有することを特徴とする組織の線維化を改善させる方法等が提供可能となった。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 (I)



(式中、Xはメトキシ基又はエトキシ基を示す。)

で示される4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物。

10

## 【請求項 2】

I型コラーゲン遺伝子の転写を抑制するための、請求項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用。

## 【請求項 3】

請求項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を有効成分として含有することを特徴とするI型コラーゲン遺伝子転写抑制剤。

## 【請求項 4】

I型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線維化を改善するための、請求項3記載のI型コラーゲン遺伝子転写抑制剤の使用。

## 【請求項 5】

請求項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を有効成分として含有することを特徴とする組織の線維化を改善させる薬剤。

20

## 【請求項 6】

線維症であると診断される乳動物に対して、有効量の請求項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を投与する工程を有することを特徴とする組織の線維化を改善させる方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物及びその利用に関する。

30

## 【0002】

## 【従来の技術】

肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全（又は慢性腎不全に陥る疾患）、炎症後の過形成痕跡、術後の痕や熱傷性痕、強皮症、動脈硬化、高血圧等の疾患や異状においては、コラーゲンに代表されるような細胞外マトリックスの過度の集積により組織が線維化して硬化し、その結果、臓器・組織の機能低下や痕形成等に至る。このような細胞外マトリックスの過度の集積は、コラーゲン等の生合成と分解とのバランスの破綻に基づくコラーゲンの産生進により導かれる。実際、線維化した組織においては、コラーゲン遺伝子、特にI型コラーゲン遺伝子の発現量が増加していることが観察されている（非特許文献1及び非特許文献2参照）。また、線維化した組織においては、サイトカインの1種であるTGF-βの量が上昇していることも観察されている（非特許文献1及び非特許文献2参照）。TGF-βは、I型コラーゲン遺伝子の発現量を増加させ、コラーゲンの産生進、ひいては、組織の線維化に関与していることが示されている（非特許文献3及び非特許文献4参照）。

40

一方、種々の動物線維症モデルにおいて、インターフェロンγの投与により、組織におけるI型コラーゲン遺伝子の発現量が低下し、コラーゲンの量が低下することにより組織の線維化が改善されることが報告されている（非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7及び非特許文献8参照）。

## 【0003】

## 【非特許文献1】

50

J. Invest. Dermatol., 94, 365, (1990)

【非特許文献2】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6642, (1991)

【非特許文献3】

Lab. Invest., 68, 171, (1990)

【非特許文献4】

J. Invest. Dermatol., 94, 365, (1990)

【非特許文献5】

Exp. Lung Res., 21, 791-808, (1995)

【非特許文献6】

Kidney Int., 47, 62-69, (1995)

【非特許文献7】

J. Hepatol., 28, 471-479, (1998)

【非特許文献8】

J. Hepatol., 26, 894-908, (1997)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、組織におけるI型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させ、コラーゲン蓄積量を低下させることにより、組織の線維化を改善させる薬剤（即ち、コラーゲン蓄積抑制剤や線維症治療剤）の開発・提供が切望されている。

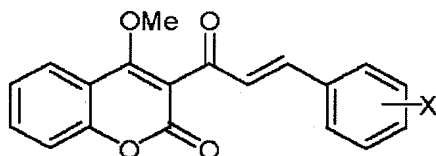
【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、かかる状況の下、鋭意検討した結果、下記の式（I）で示される4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物がI型コラーゲン遺伝子の転写を抑制する能力を有することを見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

1. 式（I）



(I)

（式中、Xはメトキシ基又はエトキシ基を示す。）

で示される4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物（以下、本発明化合物（I）と記すこともある。）；

2. I型コラーゲン遺伝子の転写を抑制するための、前項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物の使用；

3. 前項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を有効成分として含有することと特徴とするI型コラーゲン遺伝子転写抑制剤（以下、本発明転写抑制剤と記すこともある。）；

4. I型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線維化を改善するための、前項3記載のI型コラーゲン遺伝子転写抑制剤の使用；

5. 前項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を有効成分として含有することと特徴とする組織の線維化を改善させる薬剤；

6. 線維症であると診断される乳動物に対して、有効量の前項1記載の4-メトキシ-1-ベンゾピラン-2-オン化合物を投与する工程を有することと特徴とする組織の線維化を改善させる方法；

等を提供するものである。

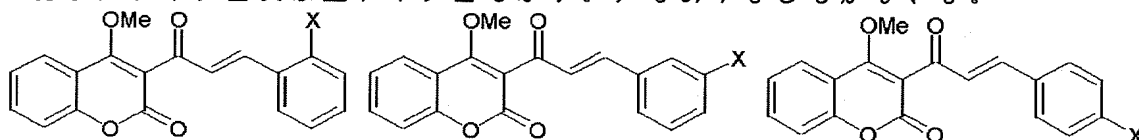
【0006】

## 【発明の実施の形態】

以下、詳細に本発明を説明する。

本発明化合物(I)は新規化合物であるが、WO97/35565号公報の特許請求の範囲に含まれる。しかしながら、当該文献には組織内におけるI型コラーゲン遺伝子の転写抑制の効果、ひいてはコラーゲン蓄積量の抑制効果についての記載は無く、また本発明化合物(I)と類似の構造を有する化合物の具体的な記載は何ら存在していない。

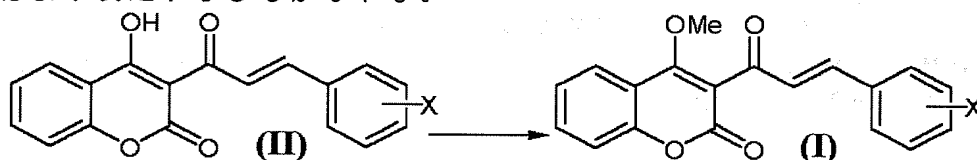
本発明化合物(I)の具体的な態様としては、例えば、以下の骨格を有する化合物(式中、Xはメトキシ基又はエトキシ基を示す。)をあげることができる。



10

## 【0007】

本発明化合物(I)は、式(II)で示される化合物(式中、Xはメトキシ基又はエトキシ基を示す。)(以下、本発明中間体(II)と記すこともある。)をメチル化することにより製造することができる。



20

メチル化の方法としては、例えば、式(II)で示される化合物とメチル化剤とを塩基の存在下で反応させる方法をあげることができる。

式(II)で示される化合物にメチル化剤を塩基の存在下で作用させる反応は、通常溶媒中で行われる。当該反応に用いられる溶媒としては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド等の酸アミド類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ヘキサメチルホスホラミド等のリン酸アミド化合物類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類等があげられる。

上記の反応に用いられる塩基としては、例えば、水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアルカリ金属水素化物類、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属の炭酸塩類、酸化銀等の銀塩類があげられる。

上記の反応に用いられるメチル化剤としては、例えば、ジメチル硫酸、臭化メチル、沃化メチル等のメチルハライド類があげられる。

上記の反応に用いられる試剤の量は、式(II)で示される化合物1モルに対して、塩基は通常1モル~2モルの割合、メチル化剤は通常1モル~2モルの割合である。

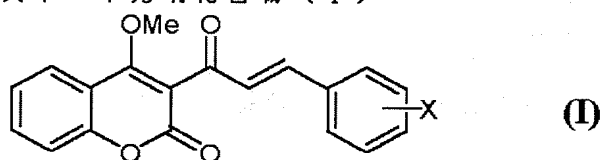
反応温度は通常0℃~100℃の範囲内、反応時間は通常1時間~200時間の範囲内である。

反応終了後、反応混合物を有機溶媒抽出し、有機層を乾燥、濃縮する等の後処理操作を行うことにより、本発明化合物(I)を単離することができる。単離された本発明化合物(I)はクロマトグラフィー、再結晶等によりさらに精製することもできる。

表1に、化合物番号(1)~(5)で表される本発明化合物(I)を例示する。

## 【0008】

表1 本発明化合物(I)



## 【0009】

50

【表 1】

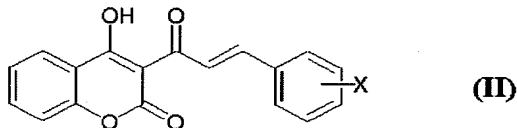
化合物番号	X	化合物番号	X
(1)	2-OMe	(4)	3-OEt
(2)	3-OMe	(5)	4-OEt
(3)	4-OMe		

10

表 2 に、化合物番号 A～E で表される本発明中間体 (II) を例示する。

【0010】

表 2 本発明中間体 (II)



【0011】

【表 2】

化合物番号	X	融点
A	2-OMe	198.5～199℃
B	3-OMe	162～164℃
C	4-OMe	190～191℃
D	3-OEt	144.5～145℃
E	4-OEt	172～172.5℃

20

30

【0012】

化合物番号 A、B、E で表される本発明中間体 (II) は特開昭 50-46666 号公報に記載され、化合物番号 C で表される本発明中間体 (II) は特開昭 50-46666 号公報及び *Pharm. Pharmacol. Commu.* 365 (1998) 等に記載されている。化合物番号 D で表される本発明中間体 (II) は、上記文献に記載された方法に準じて製造することができる。

【0013】

本発明転写抑制剤は、例えば、本発明化合物 (I) 自体、或いは、本発明化合物 (I) と、薬学的に許容される担体、賦形剤、及び／又は、医薬品添加剤、食品添加剤若しくは化粧品添加剤等とが混合されてなる組成物等であり、I 型コラーゲン遺伝子の転写を抑制する能力を有する。当該能力は、I 型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させてコラーゲン蓄積量の低下を導くことにより組織の線維化を改善するために重要であり、当該目的のための医薬品、食品、化粧品等として利用が考えられる。

40

本発明転写抑制剤の適用可能な疾患としては、コラーゲンの過度の集積により組織が線維化して硬化し、その結果、臓器・組織の機能低下や 痕形成等に起因する疾患（即ち、線維症）を治療するために用いることができる。例えば、肝硬変、間質性肺疾患、慢性腎不全（又は慢性腎不全に陥る疾患）、炎症後の過形成痕跡、術後の 痕や熱傷性 痕、強皮症、動脈硬化、高血圧等の疾患や異状等をあげることができる。

用いられる薬学的に許容される担体、賦形剤、及び／又は、医薬品添加剤、食品添加剤若

50

しくは化粧品添加剤等は、前記組成物の具体的用途に応じて適宜選択することができる。また、当該組成物の形態も、具体的用途に応じて、例えば、種々の固体、液体等の形態とすることができる。

#### 【0014】

例えば、本発明化合物(I)を医薬品として用いる場合には、具体的な形態として、例えば、散剤、細粒剤、粒剤、錠剤、シロップ剤、カプセル剤、懸濁化剤、エマルジョン剤、エキス剤及び丸剤等の経口剤、注射剤、外用液剤、軟膏剤等の経皮吸収剤、坐剤及び局所等の非経口剤等をあげることができる。

経口剤は、例えば、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、澱粉、コーンスターチ、白糖、乳糖、ぶどう糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、デキストリン、ポリビニルピロリドン、結晶セルロース、大豆レシチン、ショ糖、脂肪酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ケイ酸マグネシウム、無水ケイ酸等の担体や賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、希釈剤、保存剤、着色剤、香料、安定化剤、保湿剤、防腐剤、酸化防止剤等の医薬品添加剤を用いて、通常の方法に従って製造することができる。

投与量は、投与される乳動物の年齢、性別、体重、疾患の程度、本発明転写抑制剤の種類、投与形態等によって異なるが、通常は経口の場合にはヒト成人で1日あたり有効成分量として約1mg〜約2g、好ましくは有効成分量として約5mg〜約1gを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回または数回に分けて投与することができる。

非経口剤のうち、注射剤は、生理食塩水、滅菌水リンゲル液等の水溶性溶剤、植物油、脂肪酸エステル等の非水溶性溶剤、ブドウ糖、塩化ナトリウム等の等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、乳化剤等の医薬品添加剤を用いて、通常の方法に従って製造することができる。外用液剤、ゲル状軟膏等の経皮吸収剤、直腸内投与のための坐剤等も通常の方法に従って製造することができる。このような非経口剤を投与するには、注射(皮下、静脈内等)、経皮投与、直腸投与すればよい。局所剤は、例えば、本発明化合物(I)をエチレンビニル酢酸ポリマー等の徐放性ポリマーのペレットに取り込ませて製造することができる。このペレットを治療すべき組織中に外科的に移植すればよい。

投与量は、投与される乳動物の年齢、性別、体重、疾患の程度、本発明転写抑制剤の種類、投与形態等によって異なるが、通常は注射の場合にはヒト成人で有効成分量として約0.1mg〜約500mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回または数回に分けて投与することができる。

本発明化合物(I)を化粧品として用いる場合には、具体的な形態としては、例えば、クリーム、ローション剤等をあげることができる。ローション剤は、例えば、懸濁剤、乳化剤、保存剤等の化粧品添加剤を用いて、通常の方法に従って製造することができる。

本発明化合物(I)を化粧品として用いる場合には、具体的な形態としては、例えば、クリーム、ローション剤等をあげることができる。ローション剤は、例えば、懸濁剤、乳化剤、保存剤等の化粧品添加剤を用いて、通常の方法に従って製造することができる。

投与量は、投与される乳動物の年齢、性別、体重、疾患の程度、本発明転写抑制剤の種類、投与形態等によって異なるが、通常ヒト成人で有効成分量として約0.01mg〜約50mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回または数回に分けて投与することができる。

本発明化合物(I)を食品として用いる場合には、具体的な形態としては、例えば、粉末、錠剤、飲料、摂取可能なゲル若しくはシロップとの混合液状物、例えば、調味料、和菓子、洋菓子、氷菓、飲料、スフレッド、ペースト、漬物、ビン缶詰、畜肉加工品、魚肉・水産加工品、乳・卵加工品、野菜加工品、果実加工品、穀類加工品等の一般的な飲食物や好物等をあげることができる。また、家畜、家禽、蜜蜂、蚕、魚等の飼育動物のための飼料や餌料への食品添加物等もあげられる。

投与量は、投与される乳動物の年齢、性別、体重、疾患の程度、本発明転写抑制剤の種類、投与形態等によって異なるが、通常は注射の場合にはヒト成人で有効成分量として約0.1mg〜約500mgを投与すればよい。また、前記の1日の投与量を1回または数

10

20

30

40

50

回に分けて投与することができる。

【0015】

【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明する。

実施例1 (本発明化合物(I)の製造方法及び取得(その1))

クロロホルム142mlに3-アセチル-4-ヒドロキシクマリン39.00g、3-エトキシベンズアルデヒド28.70g及びヒペリジン12.76gを溶解し、得られた混合物をモレキュラーシーブスを充填したソックスレー抽出器で水分を除去しつつ、還流下に4時間15分加熱した。室温に冷却後、当該反応液を氷水に注加し、さらに10%塩酸、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。残をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して結晶を得た。この結晶をクロロホルムとヘキサンとの混合液(クロロホルム溶液へ結晶が析出するまでヘキサンを加える)で再結晶することにより、3-[3-(3-エトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号D)の淡黄色結晶39.59gを得た。<sup>1</sup>H-NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 1.45(7, 3H, J=7.1Hz), 4.09(9, 2H, J=7.0Hz), 6.99(7, 1H, J=2.1, 7.4Hz), 7.20~7.40(m, 5H, ), 7.69(7, 1H, J=1.5, 8.5Hz), 8.02(7, 1H, J=15.8Hz), 8.10(7, 1H, J=1.5, 8.1Hz), 8.42(7, 1H, J=15.8Hz), 11.4(s, 1H)

10

20

【0016】

実施例2 (本発明化合物(I)の製造方法及び取得(その2))

ヘキサメチルホスホラミド58mlに水素化ナトリウム(60%油性)0.87gを懸濁し、約0℃で3-[3-(2-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号A)7.00gを加え、室温に昇温して2時間した。次いで、ジメチル硫酸3.29gを加えて、100℃迄で昇温した。その後、反応混合物を氷水に注加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮した。残をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、得られた結晶をクロロホルムとヘキサンとの混合液で再結晶し、更にトルエンで再結晶することにより、3-[3-(2-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-メトキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号(1))の淡黄色結晶0.95gを得た。

30

融点: 136~136.5℃

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 3.86(s, 3H), 4.05(s, 3H), 6.91(7, 1H, J=8.6Hz), 6.97(7, 1H, J=7.6Hz), 7.24(7, 1H, J=16.4Hz), 7.28~7.42(m, 3H), 7.56~7.63(m, 2H), 7.88~7.94(1H), 7.93(7, 1H, J=16.6Hz)

【0017】

実施例3 (本発明化合物(I)の製造方法及び取得(その3))

3-[3-(2-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オンの代わりに、3-[3-(3-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号B)7.00gを用いた以外は上記の実施例2と同様にして、3-[3-(3-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-メトキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号(2))1.86gを得た。

40

融点: 142~142.5℃

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 3.83(s, 3H), 4.04(s, 3H), 6.96(7, 1H, J=2.4, 8.3Hz), 7.14(7, 1H, J=16.4Hz), 7.09(s, 1H), 7.17(7, 1H, J=8.6H

50

z), 7.28~7.38 (m, 3H), 7.58 (d, 1H, J=16.2 Hz), 7.60 (dt, 1H, J=1.7, 7.8 Hz), 7.92 (dd, 1H, J=1.2, 8.1 Hz)

## 【0018】

実施例4 (本発明化合物(I)の製造方法及び取得(その4))

3-[3-(2-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オンの代わりに、3-[3-(4-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号C)7.00gを用いた以外は上記の実施例2と同様にして、3-[3-(4-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-メトキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号(3))1.43gを得た。

10

融点: 183~185℃

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (PPm): 3.96 (s, 3H), 4.06 (s, 3H), 6.91 (d, 2H, J=8.8 Hz), 7.03 (d, 1H, J=16.4 Hz), 7.28~7.38 (m, 2H), 7.53 (d, 2H, J=8.6 Hz), 7.56 (d, 1H, J=16.1 Hz), 7.58~7.63 (m, 1H), 7.91 (dd, 1H, J=1.2, 7.8 Hz)

## 【0019】

実施例5 (本発明化合物(I)の製造方法及び取得(その5))

3-[3-(2-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オンの代わりに、3-[3-(3-エトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号D)33.60gを用いた以外は上記の実施例2と同様にして、3-[3-(3-エトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-メトキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号(4))5.47gを得た。

20

融点: 135~135.5℃

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (PPm): 1.42 (t, 3H, J=7.0 Hz), 4.05 (q, 2H, J=7.0 Hz), 4.04 (s, 3H), 6.96 (dd, 1H, J=2.2, 8.0 Hz), 7.14 (d, 1H, J=16.2 Hz), 7.07~7.20 (m, 2H), 7.20~7.37 (m, 3H), 7.59 (d, 1H, J=16.3 Hz), 7.60 (dt, 1H, J=1.7, 7.8 Hz), 7.92 (dd, 1H, J=1.2, 7.8 Hz)

30

## 【0020】

実施例6 (本発明化合物(I)の製造方法及び取得(その6))

3-[3-(2-メトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オンの代わりに、3-[3-(4-エトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号E)7.30gを用いた以外は上記の実施例2と同様にして、3-[3-(4-エトキシフェニル)-1-オキソ-2-フロベニル]-4-メトキシ-2H-1-ベンゾピラン-2-オン(化合物番号(5))0.66gを得た。

40

融点: 152~152.5℃

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (PPm): 1.43 (t, 3H, J=7.1 Hz), 4.07 (q, 2H, J=7.1 Hz), 4.05 (s, 3H), 6.90 (d, 2H, J=8.9 Hz), 7.02 (d, 1H, J=16.2 Hz), 7.28~7.38 (m, 2H), 7.52 (d, 2H, J=9.0 Hz), 7.56 (d, 1H, J=16.2 Hz), 7.58~7.63 (m, 1H), 7.91 (dd, 1H, J=1.5, 8.1 Hz)

## 【0021】

実施例7 (I型コラーゲン遺伝子の転写調節領域と結合されたレポーター遺伝子を有するプラスミドの調製)

50

正常ヒト胎児皮膚線維芽細胞 (Clontech、カタログ番号CC-2509)  $1 \times 10^8$  細胞を  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  雰囲気下で一晩培養した。培養された細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS 3mlを加えセルスクレイパー (Nalgen、カタログ番号179693) を用いて細胞を器壁から剥がした。剥がした細胞を遠心分離 ( $1,500 \text{ rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、15分間) により集め、これをPBS 20mlに懸濁して再度遠心分離した。得られた沈殿に、DNA Extraction Kit (Stratagene、カタログ番号200600) のSolution 2を11ml、Pronaseを4.8  $\mu\text{l}$  それぞれ加えて  $60^\circ\text{C}$  にて1時間振とうした後、得られた混合液を氷中に10分間放置した。次に、当該混合液に上記キットのSolution 3を4ml加えて混合した後、これを氷中に5分間放置した。遠心分離 ( $3,000 \text{ rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、15分間) し、上清を回収した。回収された上清に、当該上清1ml当たり2  $\mu\text{l}$  のRNaseを加え、 $37^\circ\text{C}$  で15分間放置した。この混合液に、2倍容量のエタノールを加えて混合し、出現した白い糸状の物質 (ゲノムDNA) を回収した。回収されたゲノムDNAを70%エタノールで洗浄した後、風乾した。風乾されたゲノムDNAを10mM Tris-HCl / 1mM EDTA (pH 8.0) (以下、TEと記す。) 500  $\mu\text{l}$  に溶解した。

得られたゲノムDNA溶解液 (ゲノムDNA 1  $\mu\text{g}$  相当量) と、配列番号1で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号2で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (10  $\text{pmol}/\mu\text{l}$ ) 各1  $\mu\text{l}$ 、蒸留水 29  $\mu\text{l}$ 、Takara LA Taq (宝酒造、カタログ番号RR002A) に添付されたbuffer 5  $\mu\text{l}$ 、Mg<sup>2+</sup> 溶液 5  $\mu\text{l}$ 、dNTP mixture 5  $\mu\text{l}$  及びTakara LA Taq (宝酒造、カタログ番号RR002A) 0.5  $\mu\text{l}$  を混合した。得られた混合物液を  $94^\circ\text{C}$ 、5分間保温した後、 $94^\circ\text{C}$ 、1分間次いで  $60^\circ\text{C}$ 、1分間さらに  $72^\circ\text{C}$ 、1分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。当該混合物液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、約0.5 kbのDNAを回収した。回収されたDNAをフェノール・クロロホルム処理した後、エタノール沈殿することによりDNAを回収した。回収されたDNAを超純水に溶解し、この溶解液にNheI 2.5  $\mu\text{l}$  及びHindIII 2.5  $\mu\text{l}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で3時間保温した。次いで、当該溶解液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、約0.5 kbのDNAを回収した。回収されたDNAをエタノール沈殿することにより再びDNA (以下、コラーゲンプロモーターDNAと記す。) を回収した。

一方、ホタルルシフェラーゼをコードする塩基配列を有するベクターPGL3 (プロメガ、カタログ番号E1751) をNheI及びHindIIIで消化した後、上記と同様にアガロースゲル電気泳動に供し、約5 kbのDNAを回収した。回収されたDNAをエタノール沈殿することにより再びDNAを回収した。回収されたDNAに蒸留水44  $\mu\text{l}$ 、Alkaline Phosphatase (宝酒造、カタログ番号2120A) に添付されたbuffer 5  $\mu\text{l}$  及びAlkaline Phosphatase (宝酒造、カタログ番号2120A) 1  $\mu\text{l}$  を加えて、この混合液を  $65^\circ\text{C}$  で30分間保温した。次に、当該混合液を2回フェノール・クロロホルム処理した後、エタノール沈殿することによりDNA (以下、LucベクターDNAと記す。) を回収した。次いで、上記コラーゲンプロモーターDNA 約20  $\text{ng}$  とLucベクターDNA 約20  $\text{ng}$  とを混合した後、DNA Ligation kit Ver.2 酵素溶液を同量添加して  $16^\circ\text{C}$  で一昼夜保温した。当該混合液に大腸菌5Hd $\alpha$  (TOYOBO、カタログ番号DNA-903) を加えて氷中に30分間放置し、次いで  $42^\circ\text{C}$ 、45秒間保温した後、得られた大腸菌を50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンナトリウム (ナカライ、カタログ番号027-39) を含むLBプレートに播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、一昼夜放置した。出現したシングルコロニーを50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンを含むLB培地2mlで  $37^\circ\text{C}$ 、12時間培養した。得られた培養液からAUTOMATIC DNA ISOLATION SYSTEM PI-50 (KURABO) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製されたプラスミドDNAの塩基配列をDNAシーケンサーで分析した。その結果、当該プラスミド (以下、COL-Lucと記す。) は、ヒトI型コラーゲン $\alpha 2$  鎖遺伝子の転写調節領域の-342~+57 (転写開始点を+1とする。) の塩基配列の下流に、ホタルルシフェラーゼをコードす

10

20

30

40

50

る塩基配列が接続されてなる塩基配列を保有していることが確認された。

【0022】

実施例8 (レポーター遺伝子の発現量を指標とした被験化合物が有するI型コラーゲン遺伝子の転写調節能力の測定)

正常ヒト胎児皮膚線維芽細胞  $1 \times 10^6$  細胞を100mmディッシュに播種し、非働化牛胎児血清(以下、FBSと記す。Gibco、カタログ番号21140-079)を10(v/v)%含むDulbecco's-MEM(日本製薬、カタログ番号05919)培地(以下、当該培地をD-MEM(+))と記す。)中で37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下において一晩培養した。次いで培地を、FBSを含まないDulbecco's-MEM培地(以下、当該培地をD-MEM(-))と記す。)に置換した。

10

D-MEM(-) 300μlに、COL-Luc 12μgが加え、得られた混合液を室温で45分間放置した(溶液1)。また、D-MEM(-) 300μlにLipofectine(Gibco、カタログ番号18292-011)20μlが加え、得られた混合液を室温で45分間放置した(溶液2)。次に、溶液1と溶液2とを混合し、これを室温で10分間放置した後、当該混合液にD-MEM(-)5.4mlを加えて混合した。当該混合液を前記正常ヒト胎児皮膚線維芽細胞に添加した後、当該細胞を37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で終夜培養した。翌日、ディッシュから培養上清を除き、細胞をPBSで2回洗浄した後、0.25%トリプシンを含むPBS 1mlを添加して細胞を剥がした。当該細胞にD-MEM(+))を加えてよく混合した後、当該細胞懸濁液を12ウエルプレートに1mlずつ分注し、これを37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で1時間培養した。このようにして培養された細胞に、前記の化合物番号(1)、(2)、(4)で示される本発明化合物(I)をそれぞれ0.5mMとなるようジメチルスルホキシド(以下、DMSOと記す。)にそれぞれ溶解させてなる溶液を、又は、前記の化合物番号(3)、(5)で示される本発明化合物(I)をそれぞれ1mMとなるようジメチルスルホキシド(以下、DMSOと記す。)にそれぞれ溶解させてなる溶液を添加(最終濃度それぞれ0.5μM、1μM)した。また、対照としてDMSOを1μl添加した。

20

1時間後、TGF-β(Pepro Tech)の5μg/ml水溶液または蒸留水を1μl添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下でさらに24時間培養した。培養された細胞をPBSで2回洗浄した後、これに細胞溶解剤(東洋インキ、カタログ番号PD10)150μlを加えセルスクレイパー(Nalgen、カタログ番号179693)を用いて細胞を器壁から剥がした。得られた細胞懸濁液を回収した後、この細胞懸濁液を遠心分離(15,000rpm、4℃、5分間)することにより、上清を回収した。回収された上清各15μlを96ウエルプレートに移した後、MICROLUMAT LB96P(EG&G BERTHOLD社製)を用いて、Lucアッセイ溶液(20mM Tricine (pH7.8)、2.67mM MgSO<sub>4</sub>、0.1mM EDTA、88.8mM DTT、270μM Coenzyme A、530μMATP、470μM Luciferin)50μlを当該プレートに自動分注した後、各ウェル内の発光量を測定した(Delay:1.6秒、Meas. Interval:5秒)。

30

一方、回収された上清5μlまたは細胞溶解剤5μlを、予め96ウエルプレートに分注された5倍希釈Protein Assay溶液(Bio-Rad、カタログ番号500-0006)200μlに加えて振とう混合した後、マイクロプレートリーダー(Bio-Rad、Benchmark)を用いて各ウェル内の595nmの吸光度を測定した。得られた値を基にし、次式に従って転写活性を算出した。

40

転写活性 = [発光量(上清添加区) - 発光量(細胞溶解剤添加区)] / [595nm吸光度(上清添加区) - 595nm吸光度(細胞溶解剤添加区)]

次に、算出された転写活性を基にし、次式に従って、TGF-βが有するI型コラーゲン遺伝子の転写促進能力に対する被験化合物の阻害効果を阻害度として算出した。

阻害度 = [転写活性(DMSO及びTGF-β添加試験区) - 転写活性(化合物及びTGF-β添加試験区)] / [転写活性(DMSO及びTGF-β添加試験区) - 転写活性(DMSO及びTGF-β無添加試験区)] × 100

50

前記の化合物番号(1)～(5)で示される本発明化合物(I)の阻害度は、いずれも70以上であり、I型コラーゲン遺伝子の転写を抑制する能力が確認された。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、組織におけるI型コラーゲン遺伝子の発現量を減少させ、コラーゲン蓄積量を低下させることにより、組織の線維化を改善させる薬剤(即ち、コラーゲン蓄積抑制剤や線維症治療剤)の開発・提供が可能となる。

【0024】

〔配列表フリーテキスト〕

配列番号1

コラーゲンプロモーターDNAを増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号2

コラーゲンプロモーターDNAを増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

【0025】

【配列表】

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> 4-Methoxy-2-pyrone compound and use thereof

<130> P154887

<160> 2

10

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify collagen promoter DNA

<400> 1

ccaagctagc cgacgtgtcc catagtgttt cc 32

<210> 2

<211> 28

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify collagen promoter DNA

<400> 2

40

ccaaaagcctt gcagtcgtgg ccagtacc 28

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1

Fターム(参考) 4C062 EE85

4C086	AA01	AA02	AA03	BA08	MA01	MA04	MA17	MA22	MA23	MA28
	MA31	MA35	MA36	MA37	MA41	MA43	MA52	MA60	MA63	MA65
	MA66	NA14	ZA42	ZA45	ZA59	ZA75	ZA81	ZA89	ZB11	ZC41